S100A9 参与乙型肝炎病毒 X 蛋白介导的 HepG2 细胞增殖与迁移*

张秀瑜 [1] 王玎 [1] 杜燕娥 [1] 武睿 [2] 段亮 [1**]

（1 重庆医科大学附属第二医院检验科 重庆 400016 2 重庆医科大学附属第一医院检验科 重庆 400016）

摘要 目的：探讨 S100A9 在乙型肝炎病毒 X（HBx）介导的 HepG2 细胞增殖及迁移中的作用。方法：用表达 HBx 蛋白的重组腺病毒 AdHBx 感染 HepG2 细胞后，用 CCK-8 实验检测细胞增殖能力及划痕愈合实验检测细胞迁移能力；在 HepG2/AdHBx 细胞中转染 S100A9-siRNA 及其对照 siRNA 后，检测 HepG2 细胞增殖及迁移能力；在 HepG2/AdHBx 和对照组 HepG2/AdGFP 细胞中，采用 Real- time PCR 及 Western Blot 检测 S100A9 基因及蛋白的表达情况；在 HepG2/AdHBx 细胞中，加入不同剂量的 NF-κB 抑制剂 BAY11-7082 后，检测各组中 S100A9 的基因及蛋白表达情况。结果：HBx 促进 HepG2 细胞的增殖与迁移；S100A9-siRNA 抑制 S100A9 的表达后，HBx 促进 HepG2 细胞的增殖与迁移的作用降低，HBx 介导的 HepG2 细胞的增殖与迁移部分依赖于 S100A9；S100A9 基因及蛋白表达在 HepG2/AdHBx 中较对照组 HepG2/AdGFP 显著升高，HBx 可致 S100A9 表达增加；抑制 NF-κB 转录活性后，AdHBx+BAY11-7082 组 S100A9 基因及蛋白表达较对照组显著降低，阻断 NF-κB 转录活性可部分抑制 HBx 调控的 S100A9 表达。结论：HBx 可调控 S100A9 的表达且与 NF-κB 活化有关， S100A9 参与 HBx 介导的 HepG2 细胞的增殖与迁移。

关键词 S100A9 HepG2 细胞 乙型肝炎病毒 X 蛋白 NF-κB

中图分类号 R73

S100A9 is involved in Hepatitis B virus X-induced proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cell HepG2

Xiuyu Zhang[1], Ding Wang[1], Rui Wu[2], Liang Duan[1]

*国家自然科学基金（81601837）资助项目，损伤相关模式分子 S100A9 调控 MDSCs 在 HBV 相关 HCC 免疫耐受中的作用

**通讯作者：段亮，电子信箱：dl13640529186@gmail.com

(1 The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

(2 The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of S100A9 on hepatocellular carcinoma cell HepG2 and the relevant mechanism. Methods: CCK-8 assay and cell migration assay were used to study HepG2 growth and migration mediated by Hepatitis B virus X (HBx) respectively. Transfected S100A9-siRNA into cells for silencing S100A9 expression, then the growth and migration of HepG2 infected with AdHBx were analyzed. Real-time PCR and Western Blot were used to detect S100A9 mRNA levels and expression in HepG2 cells infected with AdHBx or AdGFP. After the treatment with or without NF-κB inhibitor BAY 11-7082, S100A9 mRNA levels and expression in AdHBx-infected HepG2 cells were detected again. Result: HBx enhances the growth and migration of HepG2 cells. Silencing S100A9 expression partially blocked HBx-induced growth and migration of HepG2 cells. The mRNA level and protein expression of S100A9 were significantly higher in HepG2 cells infected with AdHBx than with AdGFP, and that suggests S100A9 expression can be modulated by HBx. NF-κB inhibitor treatment efficiently suppressed the increase of S100A9 levels caused by HBx. Conclusion: Expression of S100A9 is regulated by HBx-mediated NF-κB activation, and S100A9 plays an important role in HBx-induced growth and migration of hepatocellular carcinoma cell HepG2.

Key words S100A9 HepG2 cells Hepatitis B virus X NF-kappa B

肝癌是全球范围内常见的恶性肿瘤之一，在亚洲地区（尤其是中国）占恶性肿瘤发病率榜首【1】。在我国，乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）持续感染是导致肝癌发生的主要病因之一【2】。HBV 是一种部分双链环状的嗜肝 DNA 病毒，含有 pre-S/S 区、pre-C/C 区、X 区和 P 区四个部分重叠的开放阅读框，分别主要编码病毒包膜蛋白 HBs、核心蛋白 HBc、HBx 蛋白和 DNA 多聚酶【3】。其中，HBx 蛋白大小虽然只有 17 kDa，但在肝癌的发生发展中起着重要作用。有研究证实 HBx 能够参与细胞内多种基因转录的调控，具有较强的反式激活功能，能激活 Wnt/β-Catenin、NFκB、NFAT 等信号通路，具有明确的致癌活性【4，5】。

损伤相关模式分子（damage-associated molecular pattern, DAMP）是一大类细胞结构蛋白，病理情况下释放到细胞外，通过启动和介导炎症反应， 传递着细胞损伤的危险信号，例如 HMGB1、HSPs 及 S100 等【6】。其中，S100 被发现在多种炎症相关肿瘤中高表达，

并且通过激活肿瘤细胞中 TLR4 或者 RAGE 信号通路促进疾病进展【7】。目前有研究显示 S100 家族成员 S100A9 在肝癌中表达上调【8】，这提示我们在慢性病毒性肝炎到肝癌的过程中，S100A9 有可能发挥着重要的作用。因此，本研究旨在分析 S100A9 在 HBV 相关肝癌中的表达，探讨其与 HBV 重要促癌蛋白 HBx 调控关系，并进一步揭示其在 HBV 致肝癌进程中的作用。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞株及质粒

HepG2 细胞株购自美国标准菌库，培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基，置于 37℃、5% CO_2 一定饱和湿度环境条件下培养。HEK293 细胞由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室提供。荧光素酶报告质粒 p-Luc-NF-κB 由美国芝加哥大学何通川教授馈赠。

1.2 重组腺病毒及干扰 RNA

带有独立、完整 GFP 表达系统的 HBx 基因重组腺病毒载体(HBx recombinant adenovirus, AdHBx）及其对照载体由冯涛教授（分子医学与癌症研究中心，重庆医科大学）馈赠，使用前通过 HEK293 细胞将其扩增。S100A9-siRNA（上游引物 5'-GCUUCGAGGAGUUCAUCAUTT-3'和下游引物 3'-CGAAGCUCCUCAAGUAGUATT-5'）及其对照片段（上游引物 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 和下游引物 3'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-5'）均由 GenePharma 公司合成。

1.3 试剂

鼠抗人 S100A9 抗体（sc-58706，Santa Cruz）；兔抗 HBx 抗体（ab39716，abcam）；鼠抗人β-actin 抗体（sc-47778，Santa Cruz）；DMEM、胎牛血清（ fetal bovine serum，FBS）购自美国 Hyclone 公司；Trizol 试剂盒及脂质体（ Lipofectamine 2000）购自美国 Invitrogen 公司；ECL 显色剂购自北京中杉生物技术有限公司；细胞计数试剂盒购自日本 Dojindo 公司；Real time PCR 试剂购自日本 TaKaRa 公司；双荧光素酶报告分析试剂盒购自美国 Promega 公司；NF-κB 抑制剂 BAY 11-7821 购自上海碧云天公司。

2 方法

2.1 HBx 重组腺病毒的验证

将表达 HBx 基因的重组腺病毒（recombinant adenovirus）AdHBx 及其对照载体 AdGFP 在 HEK293 细胞中扩增及制备。将制备好的载体感染 HepG2 细胞，24 h 后通过 Western blot 检测 HBx 蛋白表达。

2.2 CCK8 法检测细胞增殖活性

将 HepG2/AdHBx 和 HepG2/AdGFP 组细胞用含 1%FBS 的培养基稀释成 0.5×10^5 个/ml，接种于 96 孔板中，每孔 100μL，分别培养 24、48、72 和 96 h 后每孔加入 10 μL CCK8 试剂，4 h 后在 450nm 波长下检测各孔 A 值，重复 3 次取均值。以 A 值为纵坐标，时间为横坐标，绘制生长曲线。

2.3 划痕愈合实验检测细胞迁移能力

将 HepG2/AdHBx 和 HepG2/AdGFP 2 组细胞常规培养并制成单细胞悬液接种于 6 孔板。在细胞贴壁长满后，用 20 μl 无菌枪头在培养中心区域划痕，用无血清培养基洗涤残留细胞，然后用 1% FBS 继续培养 24h。在划痕制造后的 0 h 和 72 h 在倒置显微镜下划痕宽度并拍照。计算划痕愈合的平均速度，计算公式为（0 h 划痕宽度-72 h 划痕宽度）/0 h 划痕宽度 × 100%。

2.4 Western blot 方法检测 HBx 和 S100A9 蛋白的表达

取对数生长期的细胞，用预冷的 PBS 分别洗涤 3 次，再加 50 μl 细胞裂解液和 0.2 μl PMSF，冰上裂解 30 min；4℃，12 000 r/min 离心 15 min，取上清，用 BCA 法测定细胞总蛋白浓度。将已知浓度的蛋白处理后上样至 10%SDS-PAGE 凝胶，电泳后取出凝胶于 4℃转印至 PVDF 膜；5%牛奶室温封闭 PVDF 膜 1h，加入抗β-actin、HBx 或者 S100A9 抗体（1∶1000），4℃孵育过夜；1×PBST 漂洗 PVDF 膜 3 次，加入鼠二抗（1∶2000），室温孵育 2 h，1×PBST 漂洗 PVDF 膜 3 次，DAB 显色法显色并扫描成像。实验重复 3 次。

2.5 Real time PCR 方法检测 S100A9 基因表达

培养可稳定表达 HBx 蛋白的 HepG2/AdHBx 细胞及对照 HepG2/AdGFP 细胞，24h 后收集细胞。Trizol 分别提取两组细胞总 RNA，反转录合成 cDNA，Real time PCR 检测两组细胞中 S100A9 基因水平（S100A9 上游引物 5’-GGAATTCAAAGAGCTGGTGC-3’ 及下游引物 5’-TCAGCATGATGAACTCCTCG-3’）。GAPDH 作为内参照（GAPDH 上游引物 5’-CAGCGACACCCACTCCTC-3’ 及下游引物 5’-TGAGGTCCACCACCCTGT-3’）。实验重复 3 次。

2.6 干扰 S100A9 后细胞的增殖及迁移能力分析

将 HepG2/AdHBx 细胞通过脂质体转染方式转染 S100A9-siRNA 及其对照，72 和 96 h 后通过 CCK8 分析细胞增殖能力，72 h 通过划痕愈合实验分析细胞迁移能力。

2.7 抑制 NF-κB 活性后检测 S100A9 基因及蛋白的表达

将 HepG2/AdHBx 细胞培养后加入 NF-κB 抑制剂 BAY11-7082 处理，24 h 后通过 Real time

PCR 检测 S100A9 基因表达，48 h 后通过 Western blot 检测 S100A9 蛋白表达。

2.8 双荧光素酶报告分析

在可稳定表达 HBx 蛋白的 HepG2/AdHBx 细胞及对照 HepG2/AdGFP 细胞中共转染荧光素酶报告质粒 p-Luc-NF-κB 及 pRL-TK，培养 48h 后裂解细胞收集上清。检测上清液荧光素酶活性，以 pRL-TK 为内参，以 GFP 为 1 计算相对荧光素值，每个处理组设置三个复孔。

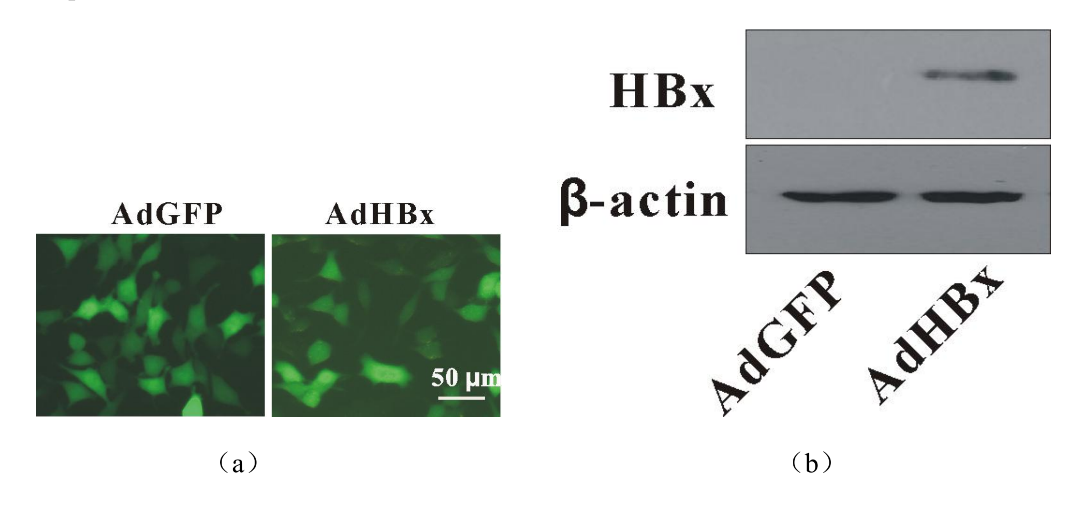
2.9 统计学分析

采用 SPSS19.0 进行统计分析。定量资料用均数±标准差（x ± s）表示，两组均数比较采用 t 检验，三组均数比较采用单因素方差分析 SNK-q 检验法。以*P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001 为差异具有统计学意义。

结果

1 稳定表达 HBx 蛋白的 HepG2 细胞模型的构建

分别将扩增的重组腺病毒 AdHBx 和对照空载腺病毒 AdGFP 感染 HepG2 细胞，24 h 后荧光显微镜观测细胞中绿色荧光蛋白 GFP 的表达，结果可见视野中细胞内绿色荧光的表达，说明 HepG2 细胞被腺病毒成功感染[图 1（a）]。随后通过 Western blot 方法检测受感染的两组细胞中 HBx 蛋白的表达，发现空载病毒 AdGFP 处理组不表达 HBx 蛋白，而重组腺病毒 AdHBx 处理组表达 HBx 蛋白[图 1（b）]。这些结果提示可稳定表达 HBx 蛋白的 HepG2 细胞（HepG2/AdHBx）模型构建成功。



（a）　　　　　　　　　　　　（b）

图 1 稳定表达 HBx 蛋白的 HepG2 细胞模型的鉴定

（a）倒置荧光显微镜观察 AdHBx 感染 HepG2 细胞的情况（50×）（b）Western-blot 检测 HBx 在感染 AdHBx 的 HepG2 细胞中的表达

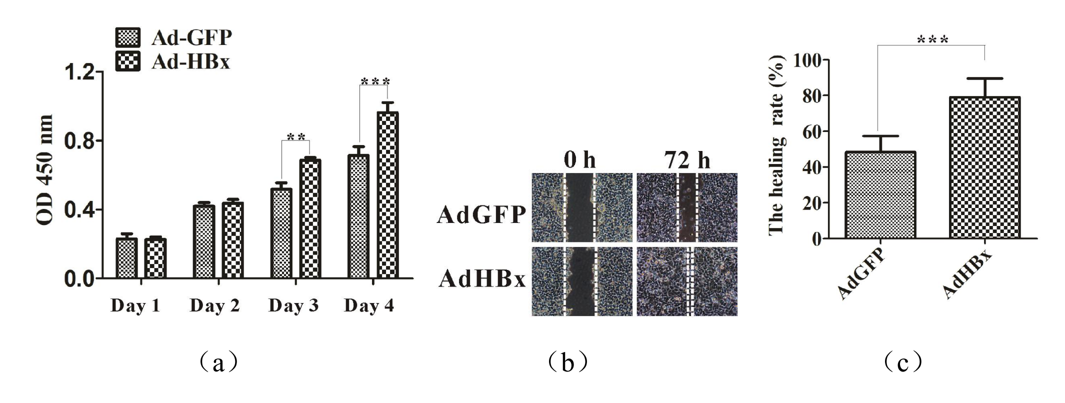
Fig.1 Identification of HBx expression in HepG2 cells infected with AdHBx

(a) fluorescence microscope observation of HepG2 cells after being infected with AdHBx(50×)

(b) HBx expression in HepG2 cells infected with AdHBx or AdGFP

2 HBx 促进 HepG2 细胞的增殖与迁移

CCK8 实验检测细胞的增殖能力。在处理第 3 及 4 天时，AdHBx 组的 OD 值分别为 0.68±0.01 及 0.96±0.05，AdGFP 组的 OD 值分别为 0.51±0.03 及 0.71±0.04，差异具有统计学意义（P<0.01 及 P<0.001）[图 2（a）]。划痕愈合实验检测细胞的迁移能力，AdHBx 组的愈合率为（79.33±8.03）%，AdGFP 组的愈合率为（48.33±5.8）%，差异具有统计学意义（P<0.001）[图 2（b 和 c）]。这些结果提示 HBx 可促进 HepG2 细胞的增殖与迁移。



（a）　　　　（b）　　　　（c）

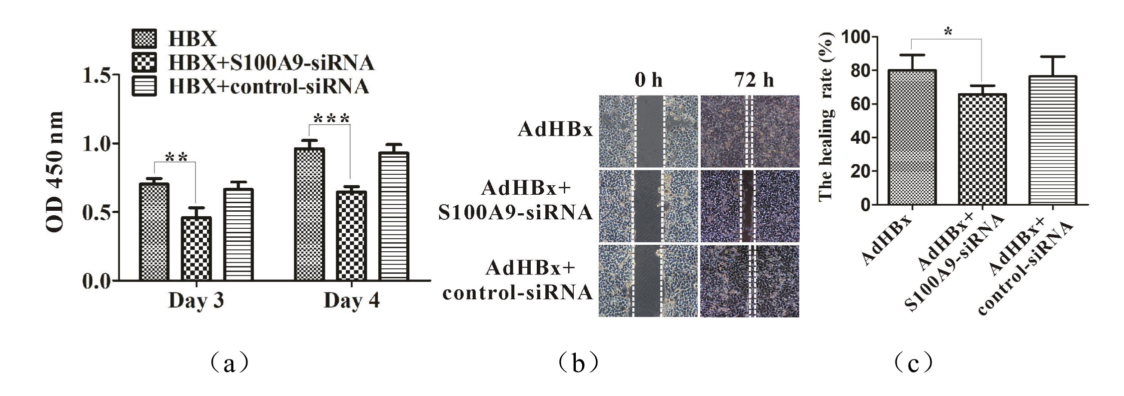
图 2 HBx 对 HepG2 细胞增殖（a）与迁移（b）（c）的作用

Fig.2 Effect of HBx on proliferation (a) and migration (b) (c) of HepG2 cells

**p<0.01, ***p<0.001 compared with HepG2 cells infected with AdHBx

3 S100A9 在 HBx 介导的 HepG2 细胞的增殖与迁移中的作用

在感染 AdHBx 的 HepG2 细胞中，通过脂质体分别转染 siRNA 及 S100A9-siRNA 抑制 S100A9 表达，CCK-8 及划痕愈合实验检测分析 S100A9 在 HBx 介导的 HepG2 细胞增殖与迁移中的作用。在处理第 3 及 4 天后，AdHBx 组的 OD 值分别为 0.69±0.04 及 0.96±0.06，HBx + S100A9 - siRNA 组的 OD 值分别为及 0.47 ± 0.03 及 0.64 ± 0.03，差异具有统计学意义（P < 0.01 及 P<0.001）[图 3（a）]；同时，划痕愈合实验结果显示，AdHBx 组的愈合率为（79 ± 6.08）%，HBx+S100A9-siRNA 组的愈合率为（66.33 ± 4.67）%，差异具有统计学意义（P<0.5）[图 3（b）]。这些结果提示 HBx 介导的 HepG2 细胞的增殖与迁移部分依赖于 S100A9。



（a）　　　　（b）　　　　（c）

图 3 S100A9-siRNA 降低 HBx 对 HepG2 细胞增殖（a）与迁移（b）（c）的促进作用

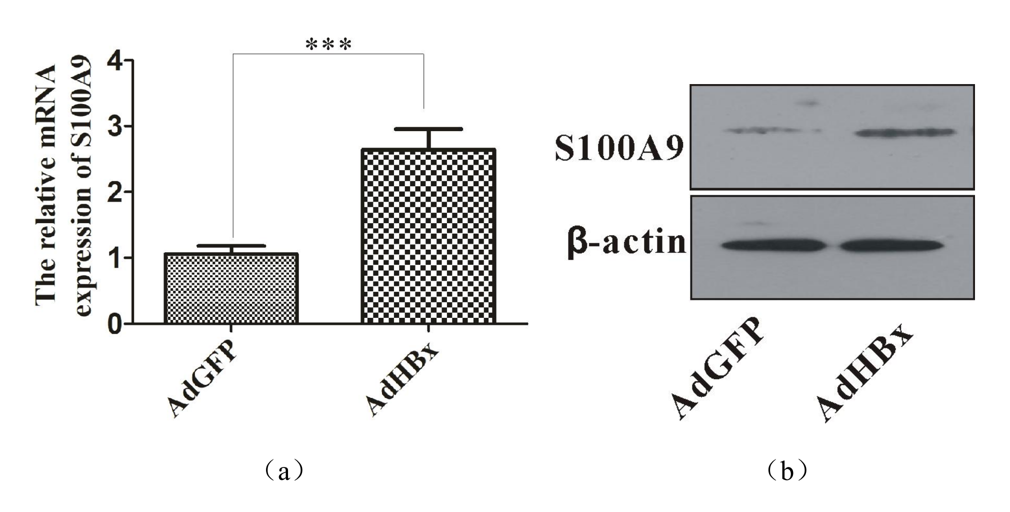
Fig.3 S100A9-siRNA reduced the promoting effect of HBx on proliferation

(a) and migration (b) (c) of HepG2 cells

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared with HepG2/AdHBx cells transfected with S100A9-siRNA

4 HBx 可调控 S100A9 的表达

HBx 介导的 HepG2 细胞的增殖与迁移与 S100A9 有关，提示 HBx 可能通过调控 S1009 的表达发挥其效应。在 AdHBx 和对照 AdGFP 感染的 HepG2 细胞中，通过 Real- time PCR 及 Western Blot 显检测了 S100A9 基因及蛋白的表达情况。AdHBx 组 S100A9 基因及蛋白表达较对照 AdGFP 组均明显升高[图 4(a 与 b)]，差异具有统计学意义（P < 0.001）。这些结果提示 HBx 可致 S100A9 表达增加。



（a）　　　　（b）

图 4 S100A9 在 HepG2/ AdHBx 细胞与 HepG2/ AdGFP 细胞中的表达

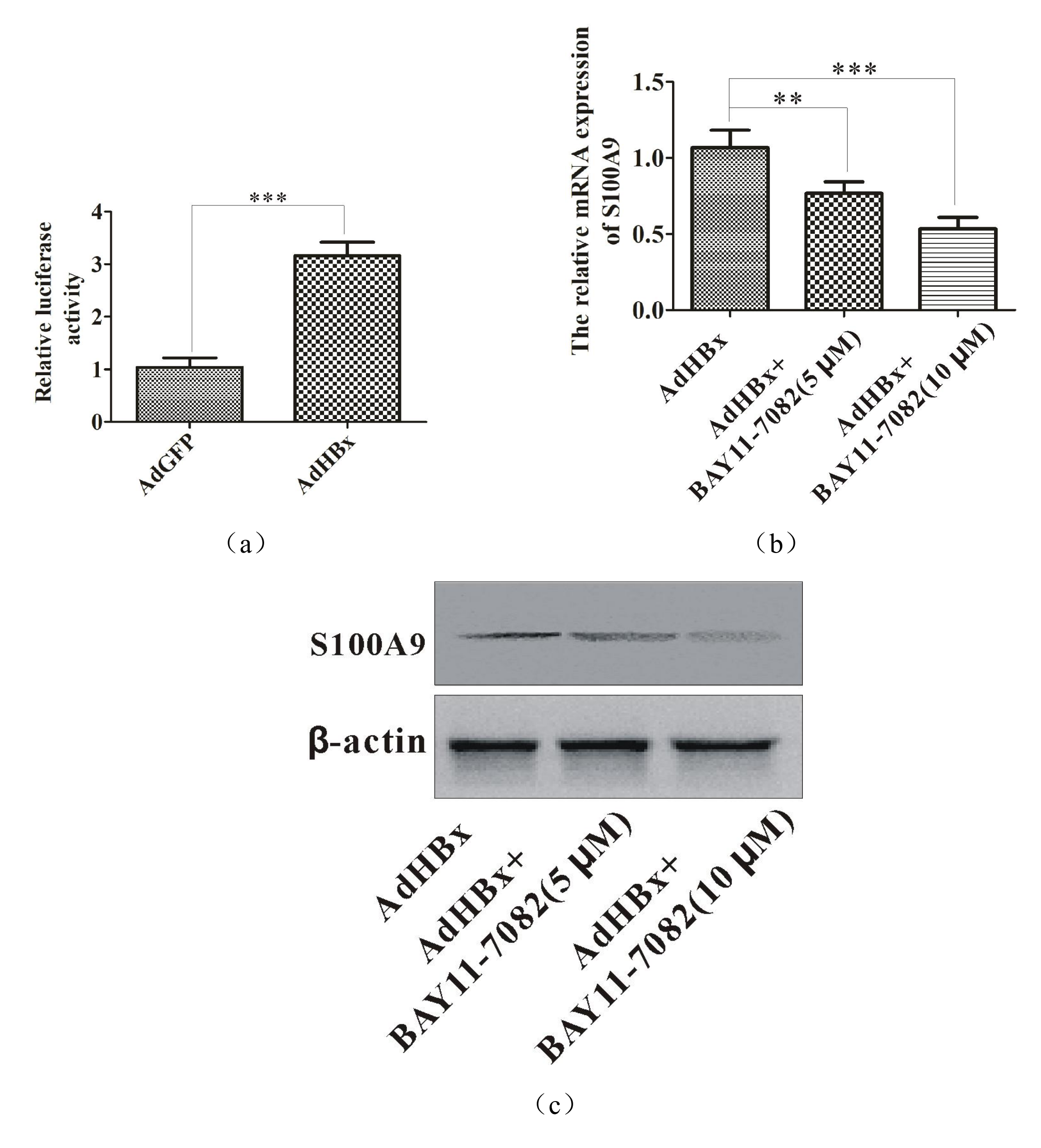
Fig.4 S100A9 expression in HepG2/ AdHBx cells and HepG2/ AdGFP

(a) Real time PCR　(b) Western blot

*** p < 0.001 compared with HepG2/AdGFP cells

5 HBx 调控 S100A9 的表达与 NF-κB 信号活化有关

NF-κB 信号活化在炎症促肿瘤发展的进程中发挥重要效应。那么 HBx 调控 S100A9 表达是否与 NF-κB 转录活性增强有关呢？通过双荧光素报告分析实验我们首先证实了 HBx 可致 NF-κB 转录活性增强[图 5(a)]，差异具有统计学意义（$P < 0.001$），提示 HBx 可增加 NF-κB 转录活性。在 AdHBx 感染的 HepG2 细胞中，加入 NF-κB 的抑制剂 BAY11-7082 即阻断 NF-κB 转录活性后，分别通过 Real time PCR 及 Western blot 方法分析 S100A9 的基因及蛋白表达情况。结果显示，AdHBx+BAY11-7082（5 或 10 μM）组 S100A9 基因水平较 AdHBx 组减低[图 5(b)]，差异具有统计学意义（$P < 0.01$ 或 $P< 0.001$），蛋白水平也得到类似的结果[图 5(c)]，提示阻断 NF-κB 转录活性可部分抑制 HBx 调控的 S100A9 表达。



（a）　　（b）

（c）

图 5 阻断 NF-κB 转录活性可抑制 S100A9 的表达

（a）双荧光素酶报告分析检测 HBx 对 NF-κB 转录活性的作用　（b） Real time PCR 检测 S100A9 在 BAY11-7082 处理过的 HepG2/ AdHBx 细胞中的基因水平　（c）Western-blot

检测 S100A9 在 BAY11-7082 处理过的 HepG2/ AdHBx 细胞中的蛋白表达

Fig.5 Blocking NF-κB transcriptional activity can suppress S100A9 expression

(a) Dual luciferase reporter assay analysis for the effect of HBx on NF-κB transcriptional activity (b) Real time PCR analysis for S100A9 mRNA level in HepG2/ AdHBx cells received treatment with BAY11-7082 (c) Western blot analysis for S100A9 expression in HepG2/ AdHBx cells received treatment with BAY11-7082

** $p<0.01$, *** $p<0.001$ compared with HepG2/AdHBx cells transfected with BAY11-7082

讨论

肝癌的发生发展是多阶段、多因素、多基因参与的复杂过程，目前大量证据表明慢性 HBV 感染是肝癌发生的高危因素。HBV 中的 HBx 蛋白具有多种生物活性，可调控多种细胞过程，包括信号转导通路、DNA 修复、细胞凋亡和细胞增殖等，具有强大的恶性转化能力，在 HBV 介导的肝癌发生发展中起着非常关键的作用【9】。有研究者报道，HBx 通过上调 YAP 的表达促进肝癌细胞的增殖，可激活 Wnt/β-catenin 信号通路，从而促进肝癌侵袭、转移【10，11】。本研究通过将稳定表达 HBx 的重组腺病毒感染肝癌 HepG2 细胞，然后 CCK-8 及 transwell 小室实验分别检测 HepG2 细胞的增殖及迁移能力，证实了 HBx 可促进 HepG2 细胞的增殖与迁移，与以前的研究结果相符。

S100A9 是钙结合蛋白 S100 蛋白家族中重要的成员之一，参与细胞生长分化、生长抑制、诱导细胞凋亡，介导炎症反应。它可通过与 Toll 样受体-4（Toll-like receptor-4，TLR-4）结合，从而激活 JNKs、p38、ERKs、NF-κB 信号传导通路发挥促炎作用【12】。在许多炎性疾病中 S100A9 的表达水平均有升高，与类风湿关节炎、炎症性肠病等多种人类炎性疾病相关【13，14】。同时，S100A9 还可参与调控病毒引起的炎症反应，在 A 型流感病毒感染中 S100A9 可促使肺炎恶化，在鼻病毒感染相关的慢性阻塞性肺病中可促进炎症加剧【15，16】。近年来，随着研究的深入，学者们发现 S100A9 作为危险信号分子，与肿瘤的诊断、预测、治疗和预后的关系密切。特别在多种感染相关的肿瘤中，发现 S100A9 表达上调，并通过激活 RAGE 等信号通路促进肿瘤进展【17，18】。目前，有研究报道 S100A9 在肝癌中高表达，且与肝癌的恶性程度密切相关【19】。基于半数以上的肝癌是与 HBV 感染有关，我们猜测作为危险信号分子的 S100A9 是否在 HBV 感染的炎症反应中发挥作用，从而促进了 HBV 相关性肝癌的发生发展。

为阐明 S100A9 在 HBV 感染相关性肝癌发生发展的作用，我们将 S100A9-siRNA 作为干预工具， 探求 S100A9 在 HBV 感染状态下对肝癌细胞系 HepG2 的生物学作用。结果发

现 HBx 通过 S100A9 促进 HepG2 的增殖和迁移，S100A9 表达被干扰后 HBx 促进 HepG2 细胞增殖与迁移的作用减弱。这一结果表明 S100A9 在 HBx 介导的肝癌细胞增殖和迁移中发挥着重要的作用，可能与肝癌的侵袭及转移有关。这也与其它研究证实 S100A9 在前列腺癌、结直肠癌中等肿瘤中的作用是一致的【20，21】。

通过进一步研究，我们还发现 S100A9 在 HBx 存在的情况下呈现高表达，但在 NF-κB 的抑制剂存在的情况下，S100A9 的表达明显降低。这一结果说明 HBx 是通过激活 NF-κB，从而增强 S100A9 的表达。以往很多研究显示 HBV 感染引起肝癌的过程中，NF-κB 异常激活，参与多向转录活性、调控免疫应答、炎性反应、细胞生长分化凋亡以及等基因的转录，在促进肿瘤发展中发挥着重要的作用，成为连接 HBV 与肝癌的重要桥梁。在肝细胞癌中 NF-κB 结合到 S100A9 启动子并激活转录，S100A9 继续激活活性氧相关信号通路，保护肝癌细胞不受细胞凋亡死亡【22】。本研究也显示 HBx 激活 NF-κB 后，NF-κB 作用于 S100A9 使其表达上调，继而促进了 HBV 感染相关性肝癌的发生发展。由此，我们推断 S100A9 可能是 NF-κB 作用的致癌因子，是搭起炎症和肿瘤之间桥梁的重要分子之一。这也提示我们通过阻止 S100A9 的表达或其生物学活性或许能为肝癌治疗提供一条新的思路。

综上所述，HBx 可通过激活 NF-κB 增强 S100A9 的表达，S100A9 可参与 HBx 介导的 HepG2 的增殖和迁移。S100A9 是 HBV 感染相关性肝癌的重要促癌因子，其在肿瘤的诊断、治疗及预后方面也许具有广阔的应用前景。 HBx、NF-κB 以及 S100A9 三者间形成一个级联放大的正反馈作用，HBx 激活 NF-κB， NF-κB 增强 S100A9 的表达，而增强的 S100A9 又促进 HBx 发挥其生物学功能，如此反复循环，促使 HBV 感染相关性肝癌的发生发展。理论上通过阻止这个环路上的任一分子的生物学活性都可干预肿瘤的发生发展，而 S100A9 作为肿瘤微环境的分泌因子是最有可能的干预靶点。

参考文献

【1】 Zhu RX, Seto WK, Lai CL, et al. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the Asia-Pacific Region. Gut Liver, 2016, 10(3): 332-339.

【2】Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. J. Hepatol, 2016, 64(1 Suppl): S84-S101.

【3】Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. Virology, 2015, 479-480: 672-686.

【4】 Zhang XD, Wang Y, Ye LH. Hepatitis B virus X protein accelerates the development of hepatoma. Cancer Biol Med, 2014, 11(3): 182-190.

【5】 Sung WK, Zheng H, Li S, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. Nat Genet, 2012, 44(7): 765-769.

【6】 Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J Leukoc Biol, 2007, 81(1):1-5.

【7】 Chen H, Xu C, Jin Q, et al. S100 protein family in human cancer. AM J Cancer Res. 2014, 4(2): 89-115.

【8】 Markowitz J, Carson WE 3rd. Review of S100A9 biology and its role in cancer. Biochim Biophys Acta, 2013, 1835(1): 100-109.

【9】 Motavaf M, Safari S, Saffari Jourshari M, et al. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: the role of the virus x protein. Acta Virol, 2013, 57(4): 389-396.

【10】 Zhang T, Zhang J, You X, et al. Hepatitis B virus X protein modulates oncogene Yes-associated protein by CREB to promote growth of hepatoma cells. Hepatology, 2012, 56(6): 2051-2059.

【11】 Chen Z, Tang J, Cai X, et al. HBx mutations promote hepatoma cell migration through the Wnt/β-catenin signaling pathway. Cancer Sci, 2016, 107 (10): 1380-1389.

【12】 Chen B, Miller AL, Rebelatto M, et al. S100A9 induced inflammatory responses are mediated by distinct damage associated molecular patterns (DAMP) receptors in vitro and in vivo. PLoS One, 2015, 10(2): e0115828.

【13】 van Lent PL, Grevers L, Blom AB, et al. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. Ann Rheum Dis, 2008, 67(12): 1750-1758.

【14】 Lee MJ, Lee JK, Choi JW, et al. Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis. PLoS One, 2012, 7(9): e38801.

【15】 Tsai SY, Seqovia JA, Chang TH, et al. DAMP molecule S100A9 acts as a molecular pattern to enhance inflammation during influenza A virus infection: role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 pathway. PloS Pathog, 2014, 10(1): e1003848.

【16】 Baines KJ, Hsu AC, Tooze M, et al. Novel immune genes associated with excessive

inflammatory and antiviral responses to rhinovirus in COPD. Respir Res, 2013, 14:15.

【17】 Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, et al. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. Biochem Pharmacol, 2006, 72(11): 1622-1631.

【18】 Srikrishna G. S100A8 and S100A9: New insights into their roles in malignancy. J Innate Immun, 2012, 4(1): 31-40.

【19】 Wu R, Duan L, Cui F, et al. S100A9 promotes human hepatocellular carcinoma cell growth and invasion through RAGE-mediated ERK1 /2 and p38 MAPK pathways. Exp Cell Res, 2015, 334(2): 228-238.

【20】 Hermani A, Hess J, De Servi B, et al. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. Clin Cancer Res, 2005,11(14): 5146-5152.

【21】 Kim HJ, Kang HJ, Lee H, et al. Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. J Proteome Res, 2009, 8(3): 1368-1379.

【22】 Nemeth J, Stein I, Haag D, et al. S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor kappa B target genes during malignant progression of murine and human liver arcinogenesis. Hepatology, 2009, 50(4): 1251-1262.